

Luís Filipe Baptista Fontes

## Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luís Filipe Baptista Fontes

# Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito de Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido e apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luís Filipe Baptista Fontes

Relatório de Estágio

Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco  
Gentil

De Outubro de 2013 a Maio de 2014

Áreas: Hematologia e Marcadores Tumoriais

Orientador externo - Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido

Orientador interno - Dra. Teresa do Carmo Pimenta Dinis Silva

## **Agradecimentos**

À instituição que me acolheu neste estágio, o Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À Direcção do Mestrado em Análises Clínicas, na pessoa da Dra. Leonor Almeida.

Ao meu Orientador externo Dr. Frederico Valido.

À minha Orientadora interna Dra. Teresa Dinis.

Aos meus amigos e co-orientadores Dr. Jorge Reis e Dr. Nuno Cunha.

Aos meus Amigos.

À minha Família.



Poderia citar alguém sábio, alguém como Einstein, um escritor como G. García Márquez, alguém mais lírico até, um quadro de R. Magritte (com a inscrição: isto não é um relatório) ou até uma fotografia tirada pelo meu fotógrafo/humanista favorito Kevin Carter, mas em vez disso, partilho a minha carta de motivação de acesso ao mestrado, infantil e irreverente, que em parte me caracteriza:

### **Carta de Motivação**

- Não sou um dos que quis ser Químico ou Bioquímico desde que nasceu, nem aos 9 nem aos 15, para mim não existiam áreas, cursos ou metas. Queria jogar Futebol, Ténis, equitação, ciclismo e tudo o que me fizesse doer os músculos. Na escola era bom a Matemática, Biologia, Química e Física e razoável a Português, era bom a Filosofar mas nunca pensei bem o meu futuro, que Hoje é o meu Presente. Apesar de me dispersar nos meus gostos (gostar de tudo) houve algo que sempre fez parte de mim: Curiosidade!

Aos 6-10 anos perguntava porque é que o céu é azul, se o ar não tem cor? Porque é que as nuvens se juntam e fazem bonecos (em vez de se dispersarem como o fumo)? Pai, porque é que o estrume dos cavalos está quente e deita fumo se estamos no Inverno? Como é que funciona este carro telecomandado? Ups, já não o sei montar e agora?

Nem sempre era tão lírico: Oh Luís (4 anos) o que fizeste aos sofás? – Estava a operar (com uma faca de talho a esquartejar sofás em pele) ...!

Muitas mais perguntas surgiram, muitas eram estúpidas, mas essas não impressionam um júri para a candidatura a mestrado.

Tive resposta para quase todas mas existe uma que nunca soube responder:

- **O que queres/querias ser?** O que queria ou quero ser, não sei, mas sei o que quero saber e aprender.

#### **- Porquê Análises Clínicas?**

A medicina tem como grande suporte as análises Clínicas, existe uma dependência óbvia entre as duas, como sempre me fascinou medicina e principalmente o diagnóstico, acho que análises clínicas é o curso perfeito para participar activamente no diagnóstico (laboratorial).

#### **- Porquê em Coimbra?**

O conhecimento não é descartável e Coimbra tem conhecimento acumulado de há muitos anos, de investigação e Ciência e eu como gosto de aprender com os mais velhos (sábios) escolho Coimbra.

**Posso não saber as respostas, mas sei pensar.**

Saudações do Candidato:

Luís Fontes



# Índice

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>I</b>
COLHEITAS: .....	4
SECTOR DA HEMATOLOGIA: .....	5
<i>Estudos realizados:</i> .....	5
SECTOR DE MICROBIOLOGIA: .....	7
QUÍMICA CLÍNICA: .....	8
ENDOCRINOLOGIA/IMUNOLOGIA: .....	9
<b>MARCADORES TUMORAIS .....</b>	<b>II</b>
IMUNOENSAIOS: .....	II
PRINCÍPIO DOS IMUNOENSAIOS: .....	II
<i>Imunoensaio competitivo:</i> .....	II
<i>Imunoensaio não competitivo (sandwich):</i> .....	12
MÉTODO DE DETERMINAÇÃO (LEITURA): .....	13
<i>Radio-imuno ensaio (RIA) e ensaio imuno-radiométrico (IRMA):</i> .....	13
<i>CLIA (Chemiluminescent Immuno Assay):</i> .....	13
<i>ECLIA (Electrochemiluminescent Immuno Assay):</i> .....	13
<i>TRACE (Time Resolved Amplified Cryptate Emission):</i> .....	13
MARCADORES TUMORAIS SÉRICOS .....	14
PROTEÍNAS .....	14
CEA (Antigénio Carcino Embrionário) .....	14
CA 15.3 (Antigénio Carbohidrato 15.3) .....	14
CA 125 (Antigénio Carbohidrato 125) .....	15
SCC (Antigénio de carcinoma das células escamosas) .....	15
CA 19.9 (Antigénio Carbohidrato 19.9) .....	16
$\alpha$ -Feto-Proteína .....	16
CA 72.4 (Antigénio Carbohidrato 72.4) .....	17
SI100 (Proteínas SI100) .....	17
Cromogranina A .....	18
Beta-2-Microglobulina .....	18
HE-4 (Proteína epididimal humana 4) .....	19
Tiroglobulina .....	19
CITOQUERATINAS .....	20
Cyfra 21.1 .....	20
ENZIMAS .....	20
NSE (Enolase específica de neurónios) .....	20
PSA (antigénio específico da próstata) .....	21
HORMONAS COMO MARCADORES TUMORAIS .....	22
Gonadotrofina Coriónica Humana ( $\beta$ -HCG) .....	22
<b>HEMATOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DO AUTOANALIZADOR BECKMAN COULTER LH 750: .....	27
<i>Princípio de Coulter (impedância eléctrica):</i> .....	27
<i>Tecnologia VCS:</i> .....	28
HEMOGRAMA: .....	28
Contagem eritrocitária (RBC) .....	28
Concentração de Hemoglobina (HGB) .....	29
Volume Corpuscular Médio (VCM) .....	29



<i>Hematócrito (HTC)</i> .....	29
<i>Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)</i> .....	29
<i>Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)</i> .....	30
<i>Índice de dispersão do volume celular (RDW)</i> .....	30
<i>Contagem Leucocitária (WBC)</i> .....	30
<i>Contagem Plaquetar (PLT)</i> .....	30
<i>Índice de dispersão do volume plaquetar e volume plaquetar (PDW)</i> .....	31
<i>Contagem de reticulócitos (RTC)</i> .....	31
<b>CITOLOGIA</b> .....	32
<i>Esfregaço de Sangue Periférico</i> .....	32
<i>Medulograma</i> .....	33
<i>Esfregaço de medula óssea:</i> .....	33
<i>Avaliação da fixação de ferro:</i> .....	34
<b>ESTUDOS MOLECULARES</b> .....	34
<b>IMUNOFENOTIPAGEM (CITOMETRIA DE FLUXO)</b> .....	34
<i>Citómetro de fluxo Coulter FC500:</i> .....	36
<b>HEMOSTASE</b> .....	37
<i>Avaliação laboratorial das alterações da coagulação:</i> .....	37
<i>Tempo de Protrombina (TP)</i> .....	37
<i>Tempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa)</i> .....	38
<i>Tempo de Trombina (TT)</i> .....	38
<i>Fibrinogénio</i> .....	38
<i>Fator VIII</i> .....	39
<i>Anticoagulante Lúpico (AL)</i> .....	39
<i>D-Dímeros (DD)</i> .....	40
<i>Proteína C (PC)</i> .....	40
<i>Proteína S livre (PS)</i> .....	40
<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	45

## **Abreviaturas**

**AFP** - alfa-fetoproteína

**AINE's** - Anti inflamatórios não esteróides.

**AL** - Anticoagulante Lúpico

**CA 125** - Antígeno Carbohidrato 125, do inglês (*Carbohydrate Antigen 125*)

**CA 15.3** - Antígeno Carbohidrato 15.3, do inglês (*Carbohydrate Antigen 15.3*)

**CA 19.9** - Antígeno Carbohidrato 19.9, do inglês (*Carbohydrate Antigen 19.9*)

**CA 72.4** - Antígeno Carbohidrato 72.4, do inglês (*Carbohydrate Antigen 72.4*)

**CEA** - Antígeno Carcinoembrionário, do inglês (*Carcinoembryonic Antigen*)

**CgA** - Cromogranina A

**CHCM** - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

**CLIA** - *Chemiluminescent Immuno Assay*

**dRVVT**- *dilute Russel's Viper Venom Time*

**ECLIA** - *Electrochemiluminescent Immuno Assay*

**FSH** - Hormona estimuladora dos folículos, do inglês (*Follicle-Stimulating Hormone*)

**HCM** - Hemoglobina Corpuscular Média

**HCT** - Hematócrito

**HGB** - Hemoglobina

**INR** - *International Normalized Ratio*

**IRMA** - *ImmunoRadioMetric Assay*

**LH** - Hormona Luteinizante (*Luteinizing Hormone*)

**LLC** - Leucemia Linfocítica Crônica

**LMC** - Leucemia Mieloide Crônica

**LMMC** - Leucemia Mielomonocítica Crónica

**NSE** - Enolase Específica de Neurónios, do inglês (*Neuron Specific Enolase*)

**PSA** - Antígeno específico da próstata, do inglês (*Prostatic Specific Antigen*)

**PT** - tempo de protrombina, do inglês (*Prothrombin Time*)

**TTPa** - Tempo de Tromboplastina Parcial activada

**RBC** - *Red Blood Cells*

**RDW** - *Red cell Distribution Width*

**RIA** - *RadiolImmuno Assay*

**RT-PCR** - *Real Time- Polymerase Chain Reaction*

**SCC** - Antígeno do carcinoma de células escamosas, do inglês (*Squamous Cell Carcinoma*)

**SPC** - Serviço de Patologia Clínica

**SPC-IPOCFG** - Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia Coimbra Francisco Gentil

**TG** - Tiroglobulina

**TRACE** - *Time Resolved Amplified Cryptate Emission*

**TSH** - Hormona estimuladora da tiróide, do inglês (*Thyroid-Stimulating Hormone*)

**TT** - Tempo de Trombina

**VCM** - Volume Corpuscular Médio

**VCS** - *Volume, Conductivity, Scatter*

**β-HCG** - Gonadotrofina Coriônica Humana, do inglês (*Human Chorionic Gonadotropin*)

## **Abstract**

This report is about my internship in the Clínica Pathology Department of Portuguese institute of Cancer Coimbra Francisco Gentil (SPC-IPOCFG). The internship had a duration of 600 hours between October 2013 and May 2014. In this time I was part of the team of technicians responsible for samples processing and interpretation of results. This report has two main focus areas of Clínica Pathology, Hematology and Tumor Markers. These choices were in part of my own personal preferences but specially because IPO treats patients with cancer, so hematology and tumor markers are very important and specific fields of this Hospital.

About Hematology, this report describes the functioning of this sub-department and also has a simple description of all parameters that are made and their interpretation.

In Tumor Markers' section, is referred the importance of their use, in special because IPOCFG treats cancer patients, so this is particularly important to refer, in my opinion.

In this training time, I had the opportunity to learn, and also to bond with my co-workers, that allowed me to face all problems as a challenge and become an independent lab technician. I had a great guidance from the institution and also a great formation acquired on my mastership.



## **Introdução**

Este relatório é relativo ao estágio realizado no Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (SPC-IPOCFG). Durante 600 horas no período de oito meses, fiz parte da equipa que integra o SPC-IPOCFG participando em todo o processo desde a receção da amostra até ao resultado analítico. O tempo de estágio foi repartido pelos cinco sectores do SPC, Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia, Endocrinologia.

O relatório foca-se em dois grandes temas: Hematologia e Marcadores Tumoriais; esta escolha tem como principais razões, o meu gosto pessoal, o facto da minha participação ter sido mais activa nestes sectores e pela importância que a Hematologia e os Marcadores Tumoriais têm no IPO. O relatório tem uma abordagem interpretativa das várias técnicas utilizadas e da importância das várias determinações no diagnóstico laboratorial.

No sector de Hematologia são abordadas as determinações executadas, de que modo se deve interpretar cada parâmetro, os seus princípios e algumas doenças associadas.

Na parte respectiva a Marcadores Tumoriais, é descrita a importância e utilização no diagnóstico e seguimento dos doentes, já que se trata de um hospital vocacionado para doentes oncológicos, pelo que, achei importante abordar este tema.

Neste período adquiri competências técnicas e de relação inter-pessoal, pude concluir com enorme satisfação que no fim do estágio tinha inteira confiança e autonomia a trabalhar em qualquer dos sectores. Isto deve-se à excelente formação que esta instituição me ofereceu.



## CARACTERIZAÇÃO DO LABORATÓRIO

O Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. (IPOCFG, E.P.E.) é uma unidade Hospitalar que integra o Sistema Nacional de Saúde, responsável pelo diagnóstico e tratamento da doença oncológica, na Região Centro, com uma população estimada de dois milhões e meio de habitantes.

O estágio foi realizado no Serviço de Patologia Clínica, que é dirigido pelo Dr. Frederico Fernando Monteiro Marques Valido, especialista em Patologia Clínica, apoiado por uma equipa com cerca de 30 elementos, constituída por médicos, farmacêuticos, bioquímicos, técnicos de análises, administrativos e auxiliares.

O SPC tem um fluxo médio diário de 300 utentes incluindo doentes de internamento e ambulatório, possui uma sala de espera, uma área administrativa de atendimento aos doentes e registo informático de todos os pedidos de análises. Cada doente possui um número de processo e cada pedido de análises tem um número de dia sequencial associado a uma letra correspondente ao dia da semana (de A a G). Cada sector insere uma etiqueta com código de barras para que as amostras sejam processadas automaticamente nos equipamentos. Uma outra área do SPC é composta por duas salas para realização das colheitas e recepção das amostras provenientes do internamento. De referir que as colheitas são realizadas apenas pelos técnicos de análises do serviço. A restante área laboral do SPC é composta pelos sectores de Hematologia, Microbiologia, Química Clínica, e Imunologia/Endocrinologia.



## Colheitas:

A colheita de amostras de sangue periférico no Laboratório de Hematologia do Serviço de Patologia Clínica do IPOCFG EPE é executada por Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica, quer na sala de colheitas do Serviço, quer nas enfermarias, quer ainda no serviço de Imunohemoterapia do mesmo Instituto. Cada tipo de análise requer um tubo apropriado, tal como apresentado na tabela I.

**Tabela I- Material utilizado para colheita das diferentes amostras.**

<b>Análise</b>	<b>Material</b>
<b>Hemocitometria e estudo morfológico</b>	Sangue venoso colhido para tubo com EDTA tripotássico (tubo de hemograma)
<b>Hemostase</b>	Sangue venoso colhido na proporção de 9 volumes de sangue para 1 de anticoagulante citrato trissódico (tubo de coagulação)
<b>Velocidade de Sedimentação</b>	(Tubo de hemograma)
<b>Urocultura/ sumária urina tipo II/ expectoração/ exsudatos/ Líquidos Biológicos.</b>	Frasco esterilizado de 150 mL
<b>Urina das 24h</b>	Frasco esterilizado de 2000 mL com ou sem Ácido Clorídrico (HCl - 50%)
<b>Cultura Microbiana a partir de zaragatoa</b>	Zaragatoa de algodão
<b>Coprocultura</b>	Frasco esterilizado de 150 mL com espátula.
<b>Cultura Microbiana a partir de seringa</b>	Seringa esterilizada.
<b>Serologica</b>	Tubo seco com esferas de Poliestereno (PE)
<b>Hemocultura</b>	Frascos “BACTEC” tampa azul e “BACT_ALERT” tampa verde.
<b>Cálcio Ionizado</b>	Seringas com heparina de lítio

### Sector da Hematologia:

O Sector da Hematologia do SPC tem uma equipa com dois médicos, um técnico superior de saúde e quatro técnicos de análises clínicas. São realizados vários tipos de análises: hemogramas, estudos de hemostase, velocidade de sedimentação, estudos de imunofenotipagem, estudos moleculares, estudos citológicos, estudos citoquímicos.

**Tabela II- Equipamentos em Hematologia.**

<b>Equipamento</b>	<b>Determinações</b>
<b>Beckman Coulter® LH750 Analyzer</b>	Hemograma
<b>Bcl da Alifax® SPA</b>	Velocidade de Sedimentação
<b>Aerospray® 7150 Hematology Slide Stainer Cytocentrifuge da WESCOR®</b>	Coloração de esfregaços
<b>ACL TOP® CTS 500 da Instrumentation Laboratory</b>	Hemostase
<b>Beckman Coulter® Cytomics™ FC 500</b> <b>Beckman Coulter® TQ Prep™ Workstation</b>	Imunofenotipagem
<b>GeneXpert® da Cepheid</b>	Estudos genéticos por reacção de PCR
<b>Microscópio ótico</b>	Observação de esfregaços

### **Estudos realizados:**

#### **Hemocitometria:**

- Hemograma
- Contagem de reticulócitos

#### **Citologia:**

- Esfregaço de sangue periférico
- Medulograma

#### **Estudos Citoquímicos:**

- Coloração de Perls
- Fosfatase alcalina leucocitária
- Mieloperoxidase

- Coloração com Ácido periódico de Schiff
- Fosfatase ácida

### **Biologia molecular:**

- Gene de fusão BCR-ABL
- Fator II e V Leiden

### **Citometria de Fluxo:**

- Estudo fenotípico dos linfócitos B circulantes

### **Provas de coagulação:**

- Tempo de protrombina (TP)
- Tempo de tromboplastina parcial activado (TTPa)
- Tempo de trombinha (TT)
- Fibrinogénio
- Factor VIII
- Anticoagulante Lúpico (AL)
- D-Dímeros (DD)
- Proteína C
- Proteína S livre
- Antitrombina III

### **Avaliação da resposta de fase aguda:**

- Velocidade de sedimentação (VS)

### Sector de Microbiologia:

Neste sector são realizados estudos bacteriológicos, micológicos e parasitológicos em diversos tipos de amostras. Estudo bioquímico da urina (sumária tipo II) com observação de sedimento. Pesquisa do organismo causador da infecção por métodos moleculares (DNA de *Clostridium* sp.).

**Tabela III- Equipamentos usados em Microbiologia.**

<b>Equipamento</b>	<b>Determinações</b>
<b>BD Bactec™ 9050 Blood Culture System</b>	Detecção de crescimento em Hemoculturas
<b>Cobas u 411 da Roche® Diagnostics</b> <b>Miditron®ST Mannheim Boehringer</b>	Sumária de Urina
<b>ATB Expression® da bioMérieux™</b>	Leitura de antibiogramas
<b>Vitek®2 Compact I5 da bioMérieux™</b>	Identificação de microorganismos
<b>UVItect BTS 20 L</b>	Leitura de galerias Crystal
<b>Câmara de fluxo laminar Forma Scientific</b>	Manipulação de amostras
<b>GeneXpert® da Cepheid</b>	Pesquisa de DNA por PCR
<b>Estufas</b>	(25°C, 37°C, 42°C)
<b>Microscópio óptico</b>	Observação morfológica

### Química Clínica:

O sector de Química Clínica tem como principal função a determinação de parâmetros bioquímicos que permitem ao clínico uma interpretação do funcionamento de alguns órgãos. O fígado, rim, pâncreas e coração são os principais órgãos monitorizados. O corpo humano é um sistema integrado, e uma disfunção num dos órgãos poderá alterar a função normal de vários órgãos. Este modelo integrado, permite através da determinação bioquímica de um parâmetro perceber o mau funcionamento de mais do que um órgão.

**Tabela IV- Equipamentos em Química Clínica.**

<b>Equipamento</b>	<b>Determinações</b>
<b>Cobas® 6000 Analyser Series HITACHI da Roche® Diagnostics</b>	Autoanalizador fotométrico/potenciométrico
<b>Cobas® c311 da Roche® Diagnostics</b>	Autoanalizador fotométrico
<b>ABL 800 FLEX da Radiometer®</b>	Calcimetro
<b>Rapidlab® I265 da Siemens</b>	Gasómetro
<b>RapidChem™ 744 da Bayer®</b>	Ionogramas
<b>Reflotron® Plus da Roche® Diagnostics</b>	Analizador de química seca
<b>Shimadzu Spectrophotometer UV-120-02</b>	Espectrofotómetro

### **Endocrinologia/Imunologia:**

Nestes sectores, são determinados: marcadores tumorais, hormonas, proteínas de fase aguda, marcadores da função cardíaca e fármacos por técnicas de imunoquímicas. É também neste sector que se realizam estudos de autoimunidade, electroforese, nomeadamente, de proteínas séricas (proteinograma), de hemoglobinas, das isoenzimas da Fosfatase Alcalina e da Lactato Desidrogenase e pesquisa da proteína de Bence-Jones.

**Tabela V- Equipamentos usados em Endocrinologia e Imunologia.**

<b>Equipamento</b>	<b>Ensaios</b>
<b>Immulite2000® XPI + VersaCell™ da Siemens</b>	Imunoensaios de quimioluminescência (CLIA)
<b>Liaison® da DiaSorin™</b>	Imunoensaios de quimioluminescência (CLIA)
<b>Cobas e411 Analyser® da Roche®</b>	Imunoensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA)
<b>ImmunoCAP® da Thermo Scientific™</b>	Imunoensaio de fluorescência enzimática (FEIA)
<b>Kryptor® da Brahms™</b>	Imunoensaio de fluorescência por 'Time-Resolved Amplified Cryptate Emission' (TRACE)
<b>Viva-E® da Siemens</b>	Imunoensaio por 'Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique' (EMIT)
<b>BN ProSpec® da Siemens</b>	Nefelometria
<b>Hydrasys® da Sebia®</b>	Electroforese e imunofixação
<b>LKB Wallac 1272 CliniGamma Counter</b>	Contador de cintilações gama



## **Marcadores Tumorais**

Os Marcadores tumorais são moléculas biologicamente estáveis. São indicadores da presença de células anormais, geralmente tumorais, que sobre-expressam essas moléculas. Os marcadores são maioritariamente proteínas, fragmentos proteicos e hormonas, existem também marcadores celulares e genéticos, no entanto, apenas os marcadores séricos (proteicos e hormonais) serão abordados neste capítulo [1,2].

Os marcadores tumorais séricos são fáceis de determinar e requerem um processo pouco invasivo (punção venosa), no entanto apresentam resultados falsos, negativos e positivos, uma boa interpretação dos dados e do contexto clínico são essenciais para este estudo. No IPOC, mais do que auxiliar no diagnóstico, os marcadores tumorais séricos, são uma ferramenta no acompanhamento do tratamento do tumor, tendo também indicação prognóstica [1-3].

### **Imunoensaio:**

Devido à natureza química (proteica), a determinação é feita por imunoensaio, em que a base é a detecção da proteína (antígeno) por um ou mais anticorpos (imunoglobulina específica). Existem diferentes princípios e métodos: ensaio competitivo ou não-competitivo/*sandwich* e para a detecção do complexo antígeno-anticorpo técnicas radioquímicas, fluorescentes, quimioluminescentes, electroquimioluminescentes, *Time-Resolved Amplified Cryptate Emission* (TRACE) e nefelométricas) [4] [5].

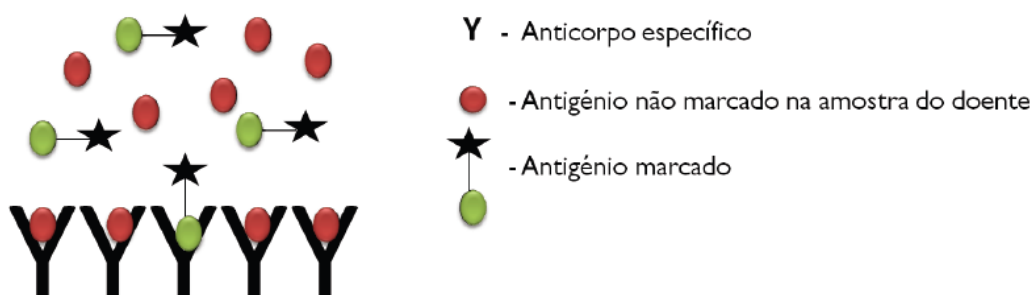
### **Princípio dos Imunoensaios:**

#### **Imunoensaio competitivo:**

Neste tipo de ensaio, o marcador em estudo (antígeno livre), é incubado na presença de um antígeno análogo marcado (ex: radioisótopo, fluorocromo, ou outro agente). Ambos os antígenos vão competir pela ligação ao anticorpo específico da fase sólida, assim quanto maior for a concentração do antígeno livre, menos antígeno marcado se liga, logo menor será o sinal emitido.



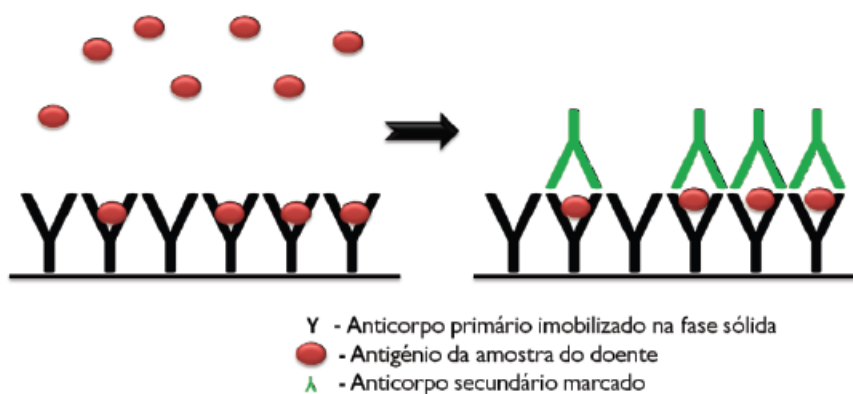
**Figura 1- Esquema ilustrativo do ensaio competitivo.**



### **Imunoensaio não competitivo (sandwich):**

Neste tipo de ensaio o marcador (antígeno) é incubado com um anticorpo específico (primário) geralmente ligado a uma matriz insolúvel sólida como micropartículas, esferas de látex ou paredes dos tubos de incubação. Numa segunda fase é adicionado um anticorpo marcado (secundário), que se liga a um epítopo (região do antígeno) diferente do local de ligação do anticorpo primário. Neste princípio quanto mais antígeno existir, maior será o sinal emitido [4].

**Figura 2- Esquema ilustrativo do ensaio não competitivo (sandwich).**



Nota: A utilização de um método, competitivo ou não-competitivo, geralmente está associada às características do antígeno (massa molecular e número de epítomos imunogénicos), pelo que normalmente antígenos de maior massa molecular são detectados por métodos não-competitivos.

## **Método de determinação (leitura):**

### **Radio-imuno ensaio (RIA) e ensaio imuno-radiométrico (IRMA):**

São imunoensaios que utilizam radioisótopos como marcador, na técnica de RIA é utilizado um antígeno marcado (técnica competitiva) e na técnica de IRMA é marcado um anticorpo secundário (não competitiva/sandwich). O rádioisótopo mais utilizado é o  $^{125}\text{I}$  e a leitura é feita num contador gama. A par da determinação é sempre feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas do analito em estudo. Estas técnicas manuais requerem um maior número de cuidados e atenção, devido aos riscos inerentes à radiação e à volatilidade do Iodo [6] [7].

Os radio-imuno ensaios, têm riscos associados que fazem com que poucas determinações sejam feitas por estes métodos, no entanto a sua sensibilidade ainda é difícil de atingir por outras técnicas.

### **CLIA (*Chemiluminescent Immuno Assay*):**

Este método tem como base a marcação do antígeno (método competitivo) ou do anticorpo (método não competitivo) por uma enzima, que na presença de um substrato luminogénico, vai produzir luz, que vai ser amplificada por um fotomultiplicador e quantificada num luminómetro [8].

### **ECLIA (*Electrochemiluminescent Immuno Assay*):**

Este método tal como o anterior, pode aplicar-se tanto aos ensaios competitivos como não competitivos. Neste método existe uma estimulação eléctrica que induz a produção de luz, devido a reacções de oxidação-redução provocadas pela corrente eléctrica (transferência de electrões) [9].

### **TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*):**

Esta tecnologia é a base de funcionamento do sistema de análise, *Kryptor da Brahms<sup>TM</sup>*. Baseia-se na transferência de energia que ocorre entre dois fluorocromos, um dador (não emissor) e um aceitador (emissor). O imunocomplexo formado com o antígeno que se pretende pesquisar, aproxima o dador e o aceitador (emissor de sinal), levando à emissão de um sinal de fluorescência, cuja intensidade depende directamente da concentração do antígeno (fenómeno de quenching) [10] [11].

## **Marcadores tumorais séricos**

### **Proteínas**

#### **CEA (Antigénio Carcino Embrionário)**

O CEA é uma glicoproteína vastamente utilizada e estudada em vários tipos de cancro, identificada em 1965 em metástases de carcinoma colo-rectal. É produzida pelas células da mucosa gastrointestinal, mas a sua função fisiológica não é totalmente conhecida, no entanto está relacionada com mecanismos de reconhecimento celular e de adesão, semelhante às imunoglobulinas [12].

#### **Utilização clínica:**

O CEA é utilizado muitas vezes como marcador complementar em associação a marcadores mais específicos em carcinomas da mama, pulmão, ovário, estômago, pâncreas e fígado.

#### **Aumentos benignos:**

Existem condições benignas que podem levar ao aumento deste marcador, como: cirrose hepática, insuficiência renal, doença pulmonar obstrutiva crónica, pneumonias, tuberculose, colite ulcerosa, diverticulite, doença de Crohn, pancreatite, quistos do ovário e hipertireoidismo.

#### **CA 15.3 (Antigénio Carbohidrato 15.3)**

O CA 15.3 é uma glicoproteína produzida nas células epiteliais glandulares e o seu aumento está particularmente associado a carcinomas da mama. O valor de referência é de < 35.0 U/mL, e apenas 1.3% da população pode apresentar valores superiores sem ter carcinoma [13] [14].

#### **Utilização clínica:**

O CA 15.3 é utilizado em doentes com cancro da mama, geralmente associado ao CEA apesar de ser mais específico e sensível. Não permite fazer um diagnóstico na parte inicial da doença pois só tardiamente o seu valor é indicativo de tumor. A sua utilização é essencialmente de acompanhamento da evolução da doença e seguimento da terapêutica,

permitindo avaliar a progressão e o prognóstico. A sua determinação também permite antecipar recidivas, antes mesmo de existirem sinais clínicos.

#### **Aumentos benignos:**

Níveis anormalmente elevados de CA 15.3 podem surgir em patologias como hepatite crónica, cirrose hepática, tuberculose, sarcoidose e lúpus eritematoso sistémico.

#### **CA 125 (Antigénio Carbohidrato 125)**

O CA 125 é uma glicoproteína membranar, sintetizada principalmente em células tumorais do ovário [15] [16].

#### **Utilização clínica:**

A principal utilização é no acompanhamento da terapêutica de carcinomas do ovário seroso e não diferenciado, apesar da sensibilidade para diagnóstico de carcinoma do ovário ser relativamente alta (80%) em alguns estádios. O seu aumento em recidivas pode anteceder os sinais clínicos. Também pode ser utilizado no seguimento de tumores do útero.

#### **Aumentos benignos:**

Aumentos inespecíficos podem surgir em patologias como: cirrose, quisto do ovário, endometriose, hepatite e pancreatite.

#### **SCC (Antigénio de carcinoma das células escamosas)**

O SCC é uma glicoproteína de superfície celular, é uma subfracção do antigénio tumoral TA-4 e foi obtido a partir de tecido carcinomatoso de células escamosas do cérvix uterino [17].

#### **Utilização clínica:**

É utilizado como marcador em carcinomas das células escamosas, do cérvix do útero, pulmão (não de pequenas células), esófago, faringe e laringe. Como tem sido realçado, também o SCC é principalmente utilizado no seguimento da terapêutica e no estudo das recidivas. Os níveis séricos do SCC também permitem avaliar o estágio da doença.

**Aumentos benignos:**

Aumentos que não estão relacionados com carcinomas poderão surgir em algumas patologias como eczemas, psoríase, insuficiência renal crónica, infecções pulmonares e patologias hepáticas.

**CA 19.9 (Antigénio Carbohidrato 19.9)**

O CA 19.9 é um antigénio obtido de linhas celulares de carcinoma colo-rectal e denominado antigénio específico do cólon (CSA), ou também conhecido como antigénio de Lewis [18].

**Utilização clínica:**

Este marcador, associado ao CEA é frequentemente usado na monitorização da terapêutica de carcinomas do pâncreas e vias biliares. Também tem utilidade na monitorização de carcinomas colo-rectais e em tumores com metastização hepática ou na vesícula biliar. Pode também estar aumentado em neoplasias dos ovários (adenocarcinoma mucinoso), tumores broncopulmonares (adenocarcinomas e carcinomas indiferenciados de grandes células).

**Aumentos benignos:**

Doenças hepáticas, pancreatites, colestase, doenças inflamatórias intestinais e autoimunes mas em valores < 200 U/L.

 **$\alpha$ -Feto-Proteína**

A  $\alpha$ -feto-proteína, é uma glicoproteína com uma composição semelhante à albumina, que se encontra em grandes concentrações no feto e permanece em valores superiores a 10 ng/mL até aos primeiros meses de vida. É usada no diagnóstico pré-natal para despiste, de Síndrome de Down [19] [20].

**Utilização clínica:**

Permite detectar e monitorizar hepatocarcinomas, sendo este o principal marcador sérico em carcinomas hepatocelulares. Por vezes encontra-se elevado em tumores germinativos do testículo (seminomas) e ovário, permitindo avaliar o crescimento da massa tumoral. Pode apresentar aumentos moderados em neoplasias gástricas, sendo neste caso um indicador de mau prognóstico.

**Aumento benignos:**

Verificam-se aumentos benignos associados a patologias hepáticas: cirrose, hepatites agudas e crônicas, gravidez e tirosinémia hereditária.

**CA 72.4 (Antigénio Carbohidrato 72.4)**

O antígeno 72.4 é uma mucina identificada em células originárias de vários tumores. É utilizado na maioria das vezes em associação com outros marcadores mais específicos de tecidos diferenciados. Na determinação deste marcador é encontrado um número reduzido de falsos positivos, principalmente em cancro do estômago [25].

**Utilização clínica:**

Devido à pequena percentagem de falsos positivos, este marcador em associação com o CEA, permite diferenciar tumores malignos de benignos com elevada probabilidade. A sua determinação é principalmente útil em tumores gastro-intestinais. Cerca de 50% dos doentes com carcinoma gástrico tem aumentos de CA 72.4. Pode ser um marcador complementar ao CA 125 nos carcinomas mucinosos do ovário.

**Aumentos benignos:**

Aumentos ligeiros do CA 72.4 podem verificar-se em doenças gastro-intestinais e inflamatórias, assim como em doentes em tratamento com inibidores das bombas de prótons (ex. omeprazol), corticóides ou AINE's.

**S100 (Proteínas S100)**

As proteínas S100, pertencem a um grupo de proteínas ácidas intracelulares de baixo peso molecular e fixadoras de cálcio. São constitutivas de células do SNC, melanócitos, células de Langerhans, músculo-esquelético, miocárdio e tecido renal.

**Utilização clínica:**

Está principalmente indicado para o estudo de metastização do melanoma maligno e outras neoplasias cutâneas. A sua determinação permite fazer acompanhamento da progressão da terapêutica e valor prognóstico.

**Aumentos benignos:**

Poderá estar aumentado em lesões do SNC, insuficiência renal, lesões cutâneas, e de forma moderada em hepatopatias e doenças auto-imunes.

**Cromogranina A**

A cromogranina A (CGA) é uma glicoproteína, pertencente a uma família de proteínas presentes nos grânulos secretores dos tecidos neuroendócrinos. Entre as várias células produtoras de CGA encontram-se as células da medula das supra-renais, células beta do pâncreas, e as pequenas células do pulmão [26] [27].

**Utilização clínica:**

Este marcador é específico para tumores neuro-endócrinos, particularmente no diagnóstico diferencial. Encontra-se elevado em feocromocitomas, tumores carcinóides gástricos, medular da tiróide, pâncreas e carcinoma de pequenas células do pulmão.

**Beta-2-Microglobulina**

A  $\beta$ -2-microglobulina (BMG) é uma glicoproteína constituinte do complexo major de histocompatibilidade da classe I. Devido ao facto de constituir o MHCI, está envolvida em processos inflamatórios, mais concretamente, no recrutamento e activação de linfócitos T [28].

**Utilização clínica:**

Pode observar-se um aumento da BMG em patologias malignas como o mieloma múltiplo, linfoma de células B, leucemias linfocíticas crónicas (LLC) e alguns tumores sólidos. A sua determinação é importante no acompanhamento da progressão do mieloma múltiplo e LLC e como indicador de prognóstico (aumento da concentração BMG indica um pior prognóstico).

**Aumentos benignos:**

Existem falsos aumentos de BMG em doentes com patologias hepáticas e renais, ou com doenças auto-imunes como Lúpus ou Artrite reumatóide.

#### **HE-4 (Proteína epididimal humana 4)**

É uma proteína precursora da proteína E4 secretada no epididímio pertencente a uma família de inibidores de proteases envolvidas na função imunitária. Esta proteína está presente no tracto genital feminino e masculino mas também noutros tecidos, embora em menor quantidade [29] [30].

#### **Utilização clínica:**

O gene que codifica a HE-4 (WFDC2) está sobre expresso em carcinomas do ovário, principalmente em carcinomas serosos e do endométrio mas não em tumores mucinosos. Este marcador permite evitar alguns falsos positivos inerentes à determinação do marcador CA 125. A combinação de HE-4 e CA 125 e o índice ROMA (um algoritmo que tem em conta o estado fértil e a relação CA 125 e HE-4) permitem estimar o risco de carcinoma do ovário.

#### **Aumentos benignos:**

A insuficiência renal é a principal patologia que poderá levar a aumentos inespecíficos do marcador HE-4.

#### **Tiroglobulina**

A tiroglobulina (TG) uma glicoproteína homodimérica, produzida nos folículos da tiróide. Esta proteína é armazenada nas células foliculares onde é integrado o iodo por acção da peroxidase, permitindo, no final, a formação da triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Existe uma relação directa entre a concentração da tiroglobulina e a massa do tecido folicular presente, daí a importância da determinação sérica, além da determinação da T3 e T4. Como nota a quantificação da tiroglobulina deverá ser acompanhado pela quantificação de anticorpos anti-tiroglobulina para excluir falsos negativos (doentes tireoidectomizados) ou valores falsamente baixos (em doentes com tiróide).

#### **Utilização clínica:**

Devido à exclusividade da síntese da tiroglobulina pelos tirócitos, esta permite avaliar na pós-tireoidectomia total a presença de tecido remanescente e a sua evolução. É um marcador essencialmente de acompanhamento pós-operatório dos doentes com diagnóstico de carcinoma diferenciado da tiróide.



### **Aumentos benignos:**

Qualquer doença benigna que afecte a tiróide provoca aumentos da TG nomeadamente tiroidites auto-imunes, bócio, doença de Basedow-Graves e tirototoxicoses.

### **Citoqueratinas**

#### **Cyfra 21.1**

Cyfra 21.1 é um fragmento da citoqueratina 19 predominante no pulmão. As citoqueratinas são uma família de proteínas responsáveis pela estabilidade das células epiteliais [21].

#### **Utilização clínica:**

É um marcador utilizado na detecção e monitorização de neoplasias epiteliais e mesenquimais do pulmão. É um marcador com valor prognóstico no carcinoma das células escamosas do pulmão. O cyfra 21.1 permite diferenciar carcinomas de pequenas células e carcinomas de grandes células. A sua concentração acompanha a evolução da terapêutica. Este marcador encontra-se aumentado em outros carcinomas: bexiga, colo do útero e carcinomas de cabeça e pescoço.

### **Aumentos benignos:**

Lesões e doenças cutâneas podem induzir aumentos anormais do marcador, assim como patologias pulmonares, gastrointestinais, ginecológicas, urológicas/renais e hepáticas.

### **Enzimas**

#### **NSE (Enolase específica de neurónios)**

É uma enzima glicolítica (fosfopiruvato hidratase) que cataliza a passagem do 2-fosfo-D-glicerato a fosfoenolpiruvato (glicólise). Existem várias isoenzimas, compostas pela combinação de 3 sub-unidades (alfa, beta e gama) sendo a isoenzima “gama-gama” a específica das células neuro-endócrinas e neurónios [22].

#### **Utilização clínica:**

Devido à especificidade da NSE para as células neuro-endócrinas, esta tem utilidade como marcador de carcinoma de células pequenas do pulmão e outros tumores neuroendócrinos. A sua quantificação permite acompanhar a evolução terapêutica.

**Aumentos benignos:**

Dado que os anticorpos monoclonais não são suficientemente específicos para permitirem a diferenciação das várias isoenzimas de NSE, aumentos não específicos podem surgir em pneumonias, choque séptico, traumatismo craniano, insuficiência renal e destruição celular, principalmente hemólise.

**PSA (antigénio específico da próstata)**

É uma enzima sintetizada pela glândula prostática e secretada no líquido seminal. Esta é sintetizada na forma de pro-PSA, e após excisão de terminais da enzima (17 aa) é secretada pelos ductos prostáticos. Esta enzima, já no líquido seminal, é inactivada pela excisão dos resíduos de lisina, evitando a formação de complexos proteicos de PSA, forma-se o PSA-livre. No soro é determinada a PSA circulante, que está ligada a proteínas transportadoras inibidoras das proteases (alfa<sub>1</sub>-antitripsina e alfa<sub>2</sub>-macroglobulina). É adicionalmente determinada a PSA-livre, ou seja, a fracção não ligada a proteínas transportadoras e a relação entre a fracção livre e a PSA total é clinicamente relevante [23].

**Utilização clínica:**

Dado que a origem do PSA é exclusiva da próstata, esta enzima apresenta enorme especificidade, sendo um excelente marcador de carcinomas da próstata. Níveis elevados de PSA são fortemente indiciadores de carcinoma da próstata. É sempre necessário ter em conta a idade e a relação PSA-livre/PSA Total, pois quanto menor for a razão, maior a probabilidade da existência de carcinoma. Os valores de PSA vão aumentando com a idade.

**Aumentos benignos:**

Podem existir falsos positivos em certos casos, como prostatites, hiperplasia benigna da próstata, infecções urinárias. É de ter em conta que na maior parte das condições benignas, a razão PSA-livre/PSA Total, mantêm-se elevada.

## **Hormonas como marcadores tumorais**

As hormonas são uma classe de moléculas de base proteica, com uma função sinalizadora (mensageira) funcionando como estimuladores ou supressores de função em células alvo.

A função hormonal respeita uma interacção cíclica entre os vários intervenientes, existindo virtualmente um eixo de ligação entre as células que respondem à hormona (glândula primária) e as células produtoras da hormona estimuladora geralmente produzida no complexo hipotálamo-hipófise. Em alguns eixos de função hormonal existem mais do que dois intervenientes celulares e não têm uma ligação directa ao complexo hipotalámico-hipofisário (ex: PTH, Calcitonina, hidroxilação da vitamina D, cálcio, receptores).

A relação entre hormonas e neoplasias baseia-se na hiperprodução da hormona, ou hiperfunção das células alvo (tumorais) provocando a frenagem da produção da hormona (mecanismo de feedback negativo) [31].

Através da determinação das hormonas ou de moléculas que são produzidas por estímulo hormonal podemos perceber a produção autónoma típica de neoplasias nesses tecidos.

Os distúrbios endócrinos podem ser despistados e as neoplasias podem ser detectadas indirectamente, através das determinações dos vários intervenientes. Poderemos desta forma ter vários distúrbios:

- Deficiência ou hiperprodução da hormona no hipotálamo;
- Deficiência ou hiperprodução da hormona na hipófise;
- Alteração dos receptores hormonais;
- Alteração das glândulas primárias;
- Alteração da resposta das células dos tecidos alvo das hormonas.

## **Gonadotrofina Coriónica Humana ( $\beta$ -HCG)**

É uma hormona glicoproteica sintetizada pelas células sinciotrofoblásticas da placenta, tendo como função preservar a secreção de progesterona e a formação do corpo lúteo. Existe sob a forma dimérica, composta por duas subunidades (alfa e beta) e o teste é falsamente denominado: “pesquisa da  $\beta$ -HCG” no entanto tanto a fracção beta como a alfa, são quantificadas [24].

**Utilização clínica:**

É um marcador típico das células germinativas. A sua utilidade prende-se à detecção, seguimento e prognóstico de doentes com tumores germinativos do testículo e ovário. É comum associar-se à determinação da HCG outros marcadores como a alfa-fetoproteína, no estudo de tumores germinativos do testículo.

**Aumentos benignos:**

Está elevada no período gestacional (gravidez), daí a sua utilização nos testes de gravidez. Poderão existir aumentos em situações como úlceras duodenais e cirrose.

**Tabela VI- As várias glândulas e hormonas que compõem o sistema endócrino.**

<b>Glândula</b>	<b>Hormona</b>	<b>Acção/Alvo</b>
<b>Hipotálamo</b>	Oxitocina*	É armazenada na hipófise posterior
	Hormona Anti-diurética (ADH)	É armazenada na hipófise posterior
	Hormonas reguladoras da hipófise anterior	Têm acção na hipófise anterior para inibir ou estimular a produção de hormonas.
<b>Hipofise</b>		
<b>Posterior</b>	Oxitocina*	Iniciar as contracções musculares no parto e produção de leite
	ADH	Activar a reabsorção de água nos rins
<b>Anterior</b>	H.Crescimento (GH)	Estimula o crescimento ósseo e muscular
	Prolactina	Promove a lactação
	Hormona estimuladora dos folículos (FSH)	Estimula o crescimento dos folículos, a produção de estrogénios ou esperma
	Hormona luteinizante (LH)	Promove a ovulação, a produção de estrogénios e progesterona; produção de esperma
	Hormona estimuladora da tiróide (TSH)	Estimula a produção e libertação de T3 e T4
	Hormona adreno-corticotropica (ACTH)	Promove a produção de glucocorticoides e androgénios no córtex adrenal
<b>Tiroide</b>	T3 (triiodotirnonina)	Aumento do metabolismo, pressão sanguínea e crescimento tecidular
	T4 (tiroxina)	Aumento do metabolismo, pressão sanguínea e crescimento tecidular.
	Calcitonina	Regular os níveis de cálcio sérico através de uma acção de menor absorção intestinal, diminuição da reabsorção tubular de cálcio, e inibição de osteoclastos

**Tabela VI- (Continuação).**

<b>Glândula</b>	<b>Hormona</b>	<b>Acção/Alvo</b>
<b>Paratiróide</b>	Hormona da paratiróide (PTH)	Aumentar a hidroxilação da vit-D (maior absorção de $\text{Ca}^{2+}$ no intestino) activação dos osteoclastos
<b>Pâncreas</b>	Insulina	Absorção da glucose pelas células
	Glucagon*	Activação da gluconeogenese
<b>Adrenais</b>		
<b>Medula</b>	Adrenalina	Resposta ao <i>stress</i> pontual, hiperglicemiante, vasoconstrição, aumento do ritmo cardíaco
	Noradrenalina	Resposta ao <i>stress</i> pontual, hiperglicemiante, vasoconstrição, aumento do ritmo cardíaco, acção neuronal.
<b>Cortéx</b>	Glucocorticoides (Cortisol)	Resposta a <i>stress</i> constante, hiperglicemiante, tensão arterial, imunossupressão
	Mineralocorticoides (Aldosterona)	Resposta a <i>stress</i> constante, tensão arterial, retenção de sódio e água
	DHEA	Percursor dos estrogéneos e androgéneos
<b>Gonadas</b>		
<b>Testiculares</b>	Androgénios (Testoesterona)	Maturação dos órgãos reprodutores, produção de esperma
<b>Ovário</b>	Estrogéneos (Estradiol)	Maturação dos órgãos reprodutores, regulação do ciclo menstrual
	Progesterona	Regulação do ciclo menstrual
<b>Pineal</b>	Melatonina*	Ciclo circadiano
<b>Células G (estômago)</b>	Gastrina	Secreção de ácido clorídrico

\*(Glucagon e Oxitocina e Melatonina) - Não são feitas determinações no SPC-IPOC



## **Hematologia**

A Hematologia é como o nome indica (*Hemaito* e *logos*) – estudo do sangue.

O estudo do sangue em análises clínicas contempla a contagem e caracterização dos três elementos celulares constituintes do sangue: eritrócitos, leucócitos e plaquetas. No sector de hematologia do SPC além do estudo celular, também é analisada a hemostase (estudo da coagulação).

O estudo do sangue, a nível celular e dos intervenientes na coagulação, é de extrema importância. O sangue reflecte frequentemente o estado de saúde do doente em estudo e no IPO este estudo é essencial, tanto em doentes com doenças hematológicas como outras doenças oncológicas, onde estas ou o seu tratamento, afectam/alteram as células sanguíneas e a sua função.

O estudo hematológico e de hemóstase assenta, essencialmente, nos seguintes exames laboratoriais:

- Hemograma;
- Medulograma;
- Velocidade de sedimentação;
- Tempos de coagulação;
- Quantificação dos factores de coagulação;
- Imunofenotipagem;
- Estudos moleculares (genes associados a doenças hematológicas).

O Hemograma é determinado automaticamente no autoanalisador (*Beckman Coulter LH 750*).

### **Princípio de funcionamento do autoanalisador Beckman Coulter LH 750:**

O autoanalisador LH 750 da Beckman Coulter baseia-se no princípio de Coulter (impedância eléctrica) e na tecnologia VCS (patenteada pela firma).

### **Princípio de Coulter (impedância eléctrica):**

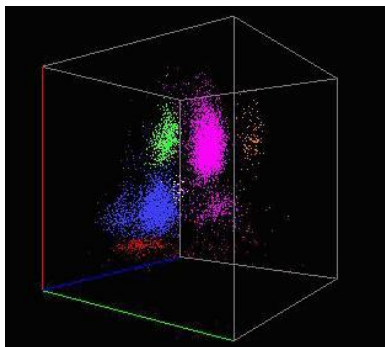
É um mecanismo de contagem de partículas baseado no princípio de que diferentes partículas, quando expostas a uma corrente eléctrica apresentam uma resistência característica, que as distingue. Na contagem celular, quanto maior for a partícula e mais complexa (conteúdo celular) maior será a resistência oferecida ao campo e quantos mais pulsos semelhantes houver, maior é o numero de partículas.



### Tecnologia VCS:

Esta tecnologia aplica-se à contagem diferencial de leucócitos. O processo começa com a lise de eritrócitos, o conjunto de células não lisadas atravessam um canal de fluxo, cujas características permitem apenas a passagem de uma célula. Nesta câmara os leucócitos (células não lisadas) são avaliados de acordo com o seu volume, condutividade e capacidade de dispersão de um laser incidente. A integração do conjunto das determinações permite traçar um gráfico de dispersão tridimensional da amostra.

**Figura 3- Esquema representativa do gráfico de dispersão.**



### Hemograma:

No hemograma estão incluídos os seguintes parâmetros:

- Contagem leucocitária (**WBC**) e fórmula diferencial;
- Contagem de eritrócitos (**RBC**);
- Concentração de hemoglobina (**HGB**);
- Hematócrito (**HTC**);
- Índices eritrocitários (**MCH, MCHC, VCM**);
- Índice de dispersão do volume celular (**RDW**);
- Contagem de plaquetas (**PLT**);
- Índice de dispersão do volume plaquetar (**PDW**).

### Contagem eritrocitária (RBC)

A contagem de eritrócitos determina o número de eritrócitos por unidade de volume de sangue, tem como valores de referência os valores entre  $4,0$  e  $5,5 \times 10^{12}$ U/L para o sexo feminino e  $4,5$  a  $6,5 \times 10^{12}$ U/L para o sexo masculino. A sua contagem é feita no autoanalisador baseado no princípio de Coulter.

### **Concentração de Hemoglobina (HGB)**

A concentração da hemoglobina consiste na quantidade de hemoglobina por unidade de volume e expressa-se normalmente em g/dL. A HGB é uma determinação muito útil, avalia a quantidade de hemoglobina no sangue, o que é importante a nível fisiológico, pela função vital desta molécula no organismo. Os valores de referência são de 11,5 a 16,5 g/dL nas mulheres e 13,0 a 18,0 g/dL nos homens. Esta determinação tem como princípio o método da cianometahemoglobina, um complexo corado que permite obter a concentração da hemoglobina de acordo com a sua absorvância a 525 nm. O seu valor de referência poderá variar de acordo com a idade e localização geográfica (altitude). Este parâmetro é particularmente usado no seguimento e diagnóstico de anemias.

### **Volume Corpuscular Médio (VCM)**

O VCM corresponde ao volume médio dos eritrócitos contados com o contador *Coulter*. Os valores de referência são de  $85 \pm 10$  fL. Valores acima de 95 fL são indicativos de macrocitose e valores inferiores a 75 fL são indicativos de microcitose.

### **Hematócrito (HTC)**

O hematócrito corresponde à relação entre o volume dos eritrócitos e o volume do sangue total (v/v). A proporção entre a fracção correspondente aos eritrócitos e a fracção plasmática é tanto dependente da quantidade de eritrócitos, como das suas características, mas também do volume do plasma. Geralmente o seu valor está a par da taxa de hemoglobina e contagem de eritrócitos. O resultado é habitualmente apresentado na forma de percentagem. Os valores de referência variam entre 36% e 46% para mulheres e 41% e 53% para homens.

No LH 750 o hematócrito é obtido a partir da fórmula de Winthrobe:

$$\text{HTC} = \text{VCM} \times \text{n}^\circ \text{eritrócitos} (\times 10^6/\mu\text{L}) \times 10$$

### **Hemoglobina Corpuscular Média (HCM)**

HCM representa o conteúdo médio de hemoglobina por eritrócitos (pg) tendo como valores de referência  $29 \pm 3$  pg; valores acima de 32 pg indicam hipercromia e abaixo de 26, hipocromia. Este parâmetro é calculado com base na seguinte fórmula:

$$\text{HCM} = (\text{HGB em g/L} / \text{RBC em n}^\circ\text{G/L})$$

### Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

CHCM é a concentração de hemoglobina por eritrócito, o seu valor é expresso em g/dL e os valores de referência são entre 30 e 35 g/dL. A fórmula de cálculo é abaixo indicada:  
 $CHCM = [HCM/VCM]$

### Índice de dispersão do volume celular (RDW)

Este índice permite avaliar a anisocitose, e tem em conta a média dos desvios-padrão do volume celular dos eritrócitos. Quanto mais elevado for o valor, maior a dispersão/diferença de volumes dos eritrócitos. Valor de referência RDW < 15.

### Contagem Leucocitária (WBC)

A contagem leucocitária representa o número de leucócitos por volume de sangue (aproximadamente 4.000 a 10.000 leucócitos por  $\mu\text{L}$  ou 4,0 a 10,0 G/L) e o leucograma, determinado por VCS, fornece as proporções dos diferentes tipos celulares que constituem o número total de leucócitos: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. O contador hematológico fornece esta informação em % e em valor absoluto.

Sempre que se justificar (presença de alarmes, nº de células elevado, avaliação clínica e historial do doente) efectua-se contagem diferencial por observação do esfregaço sanguíneo ao microscópio óptico, utilizando uma coloração tipo Romanowsky (Wright).

**Tabela VII- Interpretação do leucograma.**

WBC	Alteração	Causa
Neutrófilos	Neutrofilia	Infecção bacteriana, factores de crescimento
	Neutropenia	Fármacos, congénito
Linfócitos	Linfocitose	Infecções Viricas (Mononucleose), LLC
	Linfopenia	Imunodeficiência
Monócitos	Monocitose	Infecção bacteriana, LMMC
Eosinófilos	Eosinofilia	Reacção alérgica, infecção por helmintas, intoxicação por metais-pesados (chumbo)
Basófilos	Basofilia	LMC, Reacção alérgica

### Contagem Plaquetar (PLT)

A contagem plaquetar realizada no autoanalisador, respeita os mesmos princípios da determinação do RBC e WBC pelo princípio de Coulter. Os valores normais variam entre

150.000 a 450.000 por mm<sup>3</sup> de sangue. Existem algumas variações no que respeita aos valores dados pelo autoanalisador, como por exemplo no caso de trombocitopenia em que pode ser necessário observar o esfregaço do sangue periférico para excluir a presença de agregados plaquetares. É necessário também avaliar a presença de coágulos que podem influenciar negativamente a contagem do número de plaquetas no autoanalisador.

### **Índice de dispersão do volume plaquetar e volume plaquetar (PDW)**

O índice de dispersão do volume plaquetar é baseado no desvio padrão do volume plaquetar. É um dado que permite suspeitar de anisocitose plaquetar, no entanto é sempre necessário verificar a presença de plaquetas gigantes e anisocitose plaquetar, assim como as características das plaquetas, através da observação do esfregaço sanguíneo.

### **Contagem de reticulócitos (RTC)**



Os reticulócitos são células precursoras dos eritrócitos, com características muito próximas da célula madura, mas com RNA remanescente no citoplasma. No adulto normal o número percentual de reticulócitos em relação aos eritrócitos totais oscila entre 0,5% e 1,5%. Na gravidez a percentagem de reticulócitos pode estar aumentada e nos recém-nascidos pode ir até aos 10%.

A contagem dos reticulócitos pode ser feita pelos seguintes métodos:

- Contagem Automática: o sangue é diluído num reagente corante (“Thiazine dye New Methylene Blue”), a contagem é feita pelo autoanalisador com o recurso a um laser que identifica as células coradas e o seu valor é expresso em percentagem relativamente ao número total de eritrócitos;
- Contagem Manual: através da observação de um esfregaço sanguíneo feito a partir de uma mistura em partes iguais de sangue e corante Azul de Metileno Novo incubada 25 minutos a 25°C (coloração supravital) e contagem do número de reticulócitos em 1000 glóbulos vermelhos.

A contagem de reticulócitos é importante para avaliar a resposta medular, em casos de anemia, permitindo perceber se a medula está a responder à anemia com produção de eritrócitos.

**Tabela VIII- Interpretação de alterações dos parâmetros da série vermelha.**

Parâmetro		Alteração		Causa
HB		Anemia		Produção deficiente (RET baixos) Perdas/Hemólise (RET altos)
		Eritrocitose		EPO aumentada Fumador pesado, P.O <sub>2</sub> baixa (Policitemia vera)
MCV		GV	Microcítico	A.ferropriva (RET baixos), Talassemia (RET normais) Anemia sideroblástica
			Normocítico	A.de doenças crónicas (RET baixo/normal) A.hemolitica (RET alto)
			Macrocítico	Hepatopatia, alcoolismo, A. Megaloblástica (def. FOL/B <sub>12</sub> ) /A. perniciosa
HCM		hipocromia		Défice de ferro,Talassemia (hemoglobinopatias)
		normocromia		A. de doenças crónicas, A. hemolítica
		hipercromia		Esferocitose hereditária

## Citologia

### Esfregaço de Sangue Periférico

O esfregaço consiste na formação de uma fina película de sangue (filme), sobre a superfície de uma lâmina, de modo a poder observar-se ao microscópio, sem sobreposição de células.

No Sector de Hematologia recorre-se à coloração de Wright. As lâminas são coradas, utilizando um equipamento automático (Aerospray da Wescor).

A observação geral do esfregaço de sangue periférico tem em conta vários aspectos;

Com a objectiva de 50x e com óleo de imersão, procede-se ao seguinte estudo:

- Contagem diferencial de leucócitos com contagem de um mínimo de 200 células;

- Alterações morfológicas da série leucocitária (tamanho das células, aspecto da cromatina, forma do núcleo, presença ou não de nucléolo(s), relação núcleo-citoplasma, basofilia do citoplasma, existência ou não de grânulos);
- Presença de precursores das séries mielóide, linfóide e eritróide;
- Alterações morfológicas da série eritróide (forma, dimensão, cor e presença de células nucleadas ou corpos de inclusão);
- Alterações morfológicas das plaquetas e presença de agregados plaquetários (avaliação semi-quantitativa);
- A objetiva de 100x de imersão é utilizada sempre que for necessário observar pormenores para esclarecer alguma dúvida.

### **Medulograma**

O medulograma consiste na avaliação, através de exame microscópico, de esfregaços de medula óssea. Os medulogramas são pedidos, em casos de suspeita de leucemias ou mieloma múltiplo, esclarecimento de anemia, leucopenia ou trombocitopenia e avaliação dos depósitos de ferro. Além do estudo morfológico das células da medula óssea recorre-se também, à imunofenotipagem e a técnicas citoquímicas, para melhor caracterizar a amostra colhida.

### **Esfregaço de medula óssea:**

Na avaliação microscópica do esfregaço com a objectiva de 10x observam-se:

- fragmentos da medula óssea, para percepção da celularidade (se é uma medula hipocelular, normocelular ou hiper celular, em relação ao sexo e idade do indivíduo);
- série megacariocítica (avaliação da presença de megacariócitos);
- homogeneidade da distribuição dos componentes celulares.

Com a objectiva de 100x:

- observa-se a morfologia celular, com avaliação das alterações morfológicas das três séries;
- procede-se à contagem diferencial das linhas celulares (mielóide e eritróide);
- calcula-se a relação mielóide/ eritróide (a relação normal é de  $\approx 2:1$ );
- verifica-se a presença de células plasmáticas, atendendo à sua morfologia e percentagem;
- analisa-se a presença de células estranhas à medula óssea.

**Tabela IX-Valores de normalidade para cada fracção celular na contagem diferencial.**

<b>Série vermelha ou eritroblastica</b>	8-30 %
<b>Série dos granulócitos neutrófilos</b>	50-70 %
<b>Eosinófilos e basófilos</b>	2-4 %
<b>Monócitos</b>	2-3 %
<b>Células indiferenciadas</b>	1-2 %
<b>Megacariócitos</b>	Presentes
<b>Série “não mielóide”</b>	< 20 %

### **Avaliação da fixação de ferro:**

A avaliação dos depósitos de ferro é feita por exame microscópico de esfregaços de medula óssea, corados com azul da prússia (coloração de Perls), observando-se a presença de reservas de ferro nos fragmentos medulares e no eritroblasto (avaliação da distribuição dos grânulos de ferro - ex.: sideroblastos em anel) [32].

### **Estudos Moleculares**

No SPC-IPOC são realizados alguns estudos moleculares, um dos quais a pesquisa do gene de fusão BCR-ABL, através do sistema automatizado “Xpert BCR-ABL Monitor” que consiste num ensaio RT-PCR (*real time- polimerase chain reaction*), um ensaio importante em doentes com leucemia mielóide crónica (LMC). Mais de 95% dos pacientes com LMC possuem o cromossoma Filadélfia (PhI), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22. A translocação envolve a transferência do gene Abelson (ABL) do cromossoma 9 para o gene BCR (“breakpoint cluster region”) do cromossoma 22, resultando num gene de fusão BCR-ABL. O gene de fusão é responsável pela síntese de uma proteína, p210 (b2a2 e b3a2), uma tirosina cinase com actividade desregulada, que desempenha um papel chave no desenvolvimento da doença (LMC).

### **Imunofenotipagem (Citometria de fluxo)**

O estudo imunofenotípico por citometria de fluxo baseia-se na identificação de células, através dos antígenos celulares específicos, por meio da utilização de anticorpos monoclonais marcados com um fluorocromo. No SPC o citómetro utilizado é o FC 500 da Coulter.

As amostras estudadas são:

- Sangue periférico – colhido para tubo com EDTA e utilizado sem qualquer preparação, sendo, no entanto, feita a contagem prévia do número de linfócitos (hemograma com leucograma);
- Medula óssea – colhida para tubo com EDTA e, se necessário, é efetuada diluição com PBS;
- Gânglios linfáticos, excisados cirurgicamente, analisados após maceração e diluição das células em suspensão com PBS.

Tratamento das amostras:

- Lavagem das amostras com PBS;
- Marcação de antígenos da superfície celular com anticorpos monoclonais por imunofluorescência directa (IFD);
- Lise dos eritrócitos utilizando um reagente lisante (*FACS Lysing da Beckton Dickinson*).

**Tabela X- Análise das células no citómetro de fluxo.**

Estudo	Painel de “screening”
<b>Síndromes Linfoproliferativas</b>	CD16 / CD56 / CD 3 / CD45 / CD19
	Cadeias leves Lambda / Cadeias leves Kappa / CD20 / CD 5 / CD19
	TCR $\gamma\delta$ / TCR $\alpha\beta$ / CD3 / CD4 / CD8
<b>Painel de estudo complementar</b>	FMC7 / CD23 / CD 20 / CD22 / CD19
	CD43 / CD79b / CD20 / CD5 / CD19
	IgM / CD200 / CD20 / CD 27 / CD19
	CD103 / CD25 / CD20 / CD11c / CD19 (suspeita de Hairy cell ou LEZM)
	BCL2 / CD10 / CD20 / CD38 / CD19 (suspeita de linfoma folicular)
<b>Gamapatia Monoclonal (Mieloma Múltiplo)</b>	IgM / CD138 / CD20 / CD38 / CD19
	CD138 / CD 56 / CD45 / CD38 / CD19
	CD138 / CD28 / CD20 / CD117 / CD19
	CD38 / CD138 / CD20 / CD 27 / CD 19
	Cadeias leves Lambda / Cadeias leves Kappa / CD 45 / CD 38 / CD19



São utilizados anticorpos monoclonais marcados com um dos seguintes fluorocromos:

- FITC (Fluoresceína);
- PE (Ficoeritrina);
- ECD (Ficoeritrina “Texas Red”);
- PC5 (Ficoeritrina cianina 5.1);
- PC7 (Ficoeritrina cianina 7).

#### **Citômetro de fluxo Coulter FC500:**

O equipamento utilizado no SPC é um citômetro de fluxo Coulter FC 500. Este determina simultaneamente a dispersão de luz a 180° que avalia o tamanho celular (“forward scatter”); a dispersão de luz lateral (90°) que avalia a granulação citoplasmática, as características da membrana e a presença de estruturas internas (“side scatter”) e cinco fluorocromos, utilizando um laser de Árgon que emite a 488nm. O software do equipamento permite uma multiplicidade de operações que conduzem a uma análise multiparamétrica dos dados enviados pelo equipamento.

**Figura 4- Citômetro de fluxo Coulter FC 500 I.**

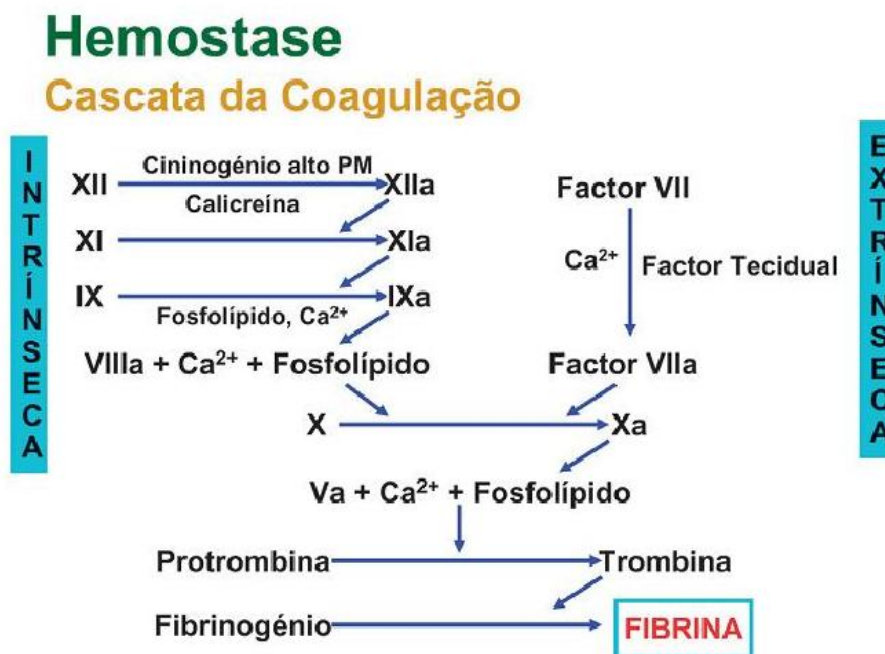


## Hemostase

A hemostase compreende um conjunto de vários mecanismos fisiológicos e moléculas intervenientes, entre os quais os factores de coagulação, as plaquetas, os vasos sanguíneos, o mecanismo da fibrinólise e os inibidores da coagulação. No processo de formação do coágulo, a produção de trombina através da cascata de coagulação é um passo fundamental.

**Figura 5- Cascata de Coagulação (*in vitro*)**

(Fonte: Dr. Pablo Pita, <http://www.linkmedica.com.br>).



### Avaliação laboratorial das alterações da coagulação:

Embora se utilize o modelo clássico da cascata da coagulação, que compreende as vias intrínseca, extrínseca e comum, para descrever as provas de coagulação, é necessário ter sempre presente que a coagulação é um modelo dinâmico, não devendo, por isso, ser compartimentado.

### Tempo de Protrombina (TP)

A determinação do TP é, por rotina, requisitado pelos clínicos, na avaliação pré-operatória, no despiste de alterações hereditárias da coagulação e na monitorização de doentes que efectuem terapêutica com anticoagulante oral (antagonistas da vitamina K). O TP é a prova de eleição para a investigação da via extrínseca da coagulação (factores V, VII, X,

protrombina e fibrinogénio). O método para avaliar o TP consiste em adicionar tromboplastina tecidular em excesso e cálcio ao plasma, em condições padronizadas. O tempo consumido, em segundos, até à formação do coágulo constitui o Tempo de Protrombina.

### **Tempo de Tromboplastina Parcial activada (TTPa)**

O TTPa é o método apropriado para investigar causas hemorrágicas hereditárias, como a hemofilia e para controlar os doentes heparinizados, pois avalia preferencialmente a via intrínseca (factores XII, XI, IX, VIII, cininogénio de alto peso molecular e pré-caliceína) e a via comum (factores X, V, protrombina e fibrinogénio) do sistema de coagulação. Esta prova consiste em adicionar ao plasma (ao qual, previamente foi removido o cálcio pelo citrato e as plaquetas, por centrifugação) cloreto de cálcio e um substituto fosfolipídico das plaquetas (tromboplastina parcial), fornecendo assim uma concentração óptima de fosfolípidos. O tempo consumido em segundos para formação do coágulo representa o tempo de tromboplastina parcial.

### **Tempo de Trombina (TT)**

A determinação do TT é utilizada para determinar alterações na transformação do fibrinogénio em fibrina pela acção da trombina, mostrando-se alongado na presença de anticoagulantes, como a heparina e nas deficiências quantitativas ou qualitativas do fibrinogénio plasmático (disfibrinogenemias). O teste consiste em adicionar ao plasma citratado uma quantidade conhecida de trombina, em condições padronizadas. O tempo em segundos, necessário para a formação do coágulo de fibrina constitui o tempo de trombina.

### **Fibrinogénio**

A diminuição do fibrinogénio pode ocorrer nos casos de hepatopatias graves em que ocorra redução da sua síntese, ou por consumo excessivo como por exemplo na coagulação intravascular disseminada. As concentrações de fibrinogénio podem encontrar-se aumentadas em casos de infeções/inflamações graves visto ser uma proteína de fase aguda. A avaliação turbidimétrica do Fibrinogénio efectua-se no Sector de Hematologia primariamente a partir do tempo de formação de coágulo obtido para o TT. Esta determinação é obtida através de uma equação matemática que utiliza a derivada da curva de coagulação correspondente ao TT. Sempre que o valor obtido se encontre fora dos limites de

referência o equipamento executa automaticamente o teste pelo método de Clauss - método de referência. Este método baseia-se no princípio de que o logaritmo do tempo de coagulação é inversamente proporcional ao logaritmo da concentração de fibrinogénio quando se adiciona uma elevada concentração de trombina ao plasma citratado diluído em solução tamponada.

### **Fator VIII**

O déficit de factor VIII é o responsável pela Hemofilia A. Dependendo do nível de factor VIII circulante é possível classificar a hemofilia segundo um grau de severidade: muito grave quando a concentração de factor é inferior a 1%; moderada se a concentração varia entre 1 e 5 % e branda quando a concentração se apresenta entre 6 e 30%. Quando se observa TTPa alongado e TP normal e após ter-se eliminado a hipótese de presença de inibidores da coagulação, suspeita-se da deficiência de factor VIII. Assim, misturando em parte iguais um plasma normal com o plasma deficiente em factor VIII corrige-se o TTPa (se se mantém alongado supõe-se estar na presença de inibidores).

### **Anticoagulante Lúpico (AL)**

Trata-se de uma condição descrita em alguns doentes com síndrome antifosfolípido primário ou secundário a lúpus eritematoso sistémico, que apresentam um aumento do TTPa. De salientar que nem todos os reagentes para o teste de TTPa apresentam a mesma sensibilidade ao AL. O AL é devido à presença de auto anticorpos dirigidos contra glicoproteínas ( $\beta_2$  glicoproteína I ou a protrombina) unidas a fosfolípidos e que interferem em estudos *in vitro* da coagulação, sendo também frequente a presença de auto anticorpos antifosfolípido (anticardiolipina). A metodologia para detectar a presença de AL baseia-se na capacidade que o AL apresenta de prolongar tempos de coagulação em técnicas dependentes de fosfolípidos (TTPa), que não se corrigem com a mistura com pool de plasmas normais, mas sim com a adição de fosfolípidos. Para a avaliação da presença de AL a amostra deverá ser duplamente centrifugada (2x15 minutos a 2500 G) para garantir a ausência total de contaminação plaquetar. A metodologia do teste consiste em executar um TTPa com recurso a reagente de veneno de víbora de Russell diluído (DRVV), para o “screen” e com recurso a um reagente DRVV enriquecido com fosfolípidos para confirmar a presença de AL.

## **D-Dímeros (DD)**

Sempre que ocorre fibrinólise, encontram-se em circulação pequenas concentrações dos produtos de degradação da fibrina que, posteriormente serão eliminados pelo fígado e pelo sistema reticuloendotelial. De entre estes o Dímero-D é referenciado como específico da degradação da fibrina através da plasmina e o valor de referência é inferior a 278 ng/mL para o reagente em uso no SPC. As quantidades plasmáticas de DD podem aumentar em várias situações clínicas como: trombose venosa profunda, embolia pulmonar, tumores e coagulação intravascular disseminada. Para a detecção e avaliação semi-quantitativa *in vitro* dos DD utiliza-se uma técnica de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com um anticorpo monoclonal anti DD, não reagindo com o fibrinogénio.









## **Proteína C (PC)**

Presente no plasma como zimogénio cuja síntese é dependente da vitamina K, a PC é activada *in vivo* pela ligação da trombina à trombomodulina. *In vitro* o reagente utilizado como activador possui uma fracção proteica obtida do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix*. A quantidade de PC activada é determinada pela sua acção sobre o substrato cromogénico que liberta p-nitroanilina, de cor amarela. A PC apresenta-se diminuída em fase aguda de trombose. Insuficiência hepática, coagulação intravascular disseminada e tratamento com fármacos anti vitamina K reduzem substancialmente os seus níveis.

## **Proteína S livre (PS)**

A PS é um cofactor não enzimático da PC activada, vitamina K dependente. Surge na forma livre funcionante ou ligada à fracção do complemento C4BP, não apresentando neste caso actividade como cofactor. O défice de PS pode ter origem hereditária ou adquirida. Défice adquirido pode ser observado em situações de gravidez, terapia com anticoagulante oral, contracepção oral ou doença hepática. A deficiência em PS está frequentemente associada a elevado risco de tromboembolismo venoso, especialmente em jovens. A sua presença é detetada pelo incremento de turvação devido à aglutinação de dois reagentes de látex. O C4BP purificado adsorvido no reagente de látex I reage com elevada afinidade com a PS na presença de iões  $\text{Ca}^{2+}$ . A fracção livre da proteína S ligada à fracção do complemento C4BP despoleta a reacção de aglutinação com o segundo reagente de látex conjugado com anticorpos monoclonais contra PS humana. O nível de aglutinação será directamente proporcional à concentração de PS na amostra em estudo.

**Tabela XI- Interpretação dos dados de Coagulação.**

Parâmetros		Anomalia	Patologia
Hemostase primária			
Tempo de sangramento		Endotélio vascular intacto? Plaquetas/factor V.Willenbrand	Trombocitopenia Doença de Von Willenbrand
Contagem plaquetar		Primária	Trombocitémia essencial
		Secundária	Reactiva: estimulação da medula óssea
		Diminuição de produção	Aplasia medular Produção ineficaz (def. Vit B12/FOL) AINE's
		Destruição	Esplenomegalia/Hepatopatia
		Imune	Lúpus
		Não imune	Síndrome Hemolítico Urémico
Cascata de Coagulação			
PT	PTT		
N	N	Não há deficiência nos factores	Sem doença associada
		Deficiência de factores (I,II,V,VII,X)	Anticoagulante oral Défice de Vit K Hepatopatia (< factor V)
N		Deficiência de factores (VIII,IX,XI,XII)	Anticoagulantes (heparina) Hemofilia A (VIII) Hemofilia B (IX) Anticoagulante lúpico (ind. VIII) Doença de von Willenbrand
	N	Deficiência do factor VII	Hereditária ou adquirida
Fibrinogenio			
		Deficiência do factor I: hipo/afibrinogénemia	Hepatopatia Doença congénita ou hereditária



## Conclusão

Este relatório corresponde a uma ínfima parte do conhecimento que adquiri durante o estágio, pois não é possível expor no relatório, o conhecimento moral e relacionamento inter-pessoal que tive, a própria dinâmica do serviço, os casos interessantíssimos e todo um vasto conhecimento. Posso dizer que comecei com medo que a minha falta de experiência profissional me trouxesse dificuldades de integração no Serviço, mas isso não se notou, tanto pela boa formação adquirida no Mestrado em Análises Clínicas, como pela boa forma com que fui recebido pelo SPC.

Não é possível dissociar este estágio do Mestrado em Análises Clínicas, que além de me fornecer o conhecimento base para poder frequentar o estágio, me deu a oportunidade de conhecer uma realidade particular que é a do IPO. Ver uma realidade onde às vezes o nome da doença é mais assustadora do que a doença, enfrentar o medo da morte todos os dias, é uma realidade dura, que valoriza muito o nosso trabalho.

O Cancro, mal definido em dicionários, em artigos jornalísticos, e mal percebido. O Cancro não se percebe, até se conviver com ele de perto. Então porquê este peso atribuído a esta doença? O cancro não é apenas o tumor, é o seu tratamento, é a perda de cabelo, é o mal-estar é a dor constante, é a perda de parte do corpo, é a doença que mesmo tratada nos afectará para toda a vida, vida que às vezes é efémera após se saber que se tem cancro.

O que tirei de melhor neste estágio foi perceber que independentemente do desafio, sou capaz de integrar uma equipa, aprender, ter dinamismo e rapidamente tornar-me autónomo. Este estágio deu-me para perceber que sentirei sempre uma grande necessidade de fazer investigação e de procurar melhorar os processos e perceber as doenças, porque há muito por descobrir sobre cancro e muitas coisas a melhorar, inclusive no diagnóstico laboratorial.





## Bibliografia

1. *Tumor markers in diagnostic pathology.* Clin Lab Med, 1990. **10**(1): p. 1-250.
2. *Clinical value of tumor markers.* Ann Chir Gynaecol, 1989. **78**(1): p. 6-82.
3. *Tumor markers.* Semin Oncol, 1987. **14**(2): p. 85-234.
4. Pacsa, S., [Enzyme immunoassay in the detection of tumor markers]. Morphol Igazsagugyi Orv Sz, 1983. **23**(2): p. 119-26.
5. Meany, D.L., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Early Detection of Cancer: Immunoassays for Plasma Tumor Markers.* Expert Opin Med Diagn, 2009. **3**(6): p. 597-605.
6. Fusco, A., et al., [Quality control of the RIA method for 3 tumor markers]. Minerva Med, 1987. **78**(7): p. 463-4.
7. Gacci, M., et al., *Pre and postoperative quantitative detection of fragments of cytokeratins 8 and 18 (UBC IRMA) as markers of early recurrence of superficial bladder tumor.* Arch Ital Urol Androl, 2006. **78**(1): p. 5-10.
8. Bagazgoitia, F.J., et al., *Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for urinary albumin.* J Biolumin Chemilumin, 1989. **3**(4): p. 169-74.
9. Prieto, B., et al., *New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement.* Clin Chem Lab Med, 2010. **48**(6): p. 835-8.
10. Prieto, B., et al., *Plasma procalcitonin measured by time-resolved amplified cryptate emission (TRACE) in liver transplant patients. A prognosis marker of early infectious and non-infectious postoperative complications.* Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(5): p. 660-6.
11. Llorente, E., et al., *Umbilical cord blood serum procalcitonin by Time-Resolved Amplified Cryptate Emission (TRACE) technology: reference values of a potential marker of vertically transmitted neonatal sepsis.* Clin Chem Lab Med, 2007. **45**(11): p. 1531-5.
12. Blundell, G.P., *Carcinoembryonic antigen (CEA): a review and current status.* Med Ann Dist Columbia, 1973. **42**(5): p. 222-4.
13. Kokko, R., K. Holli, and M. Hakama, *Ca 15-3 in the follow-up of localised breast cancer: a prospective study.* Eur J Cancer, 2002. **38**(9): p. 1189-93.
14. Shitrit, D., et al., *Diagnostic value of CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9, CA 15-3, and CA 125 assays in pleural effusions: analysis of 116 cases and review of the literature.* Oncologist, 2005. **10**(7): p. 501-7.
15. Thomakos, N., et al., *Serum CA 125, CA 15-3, CEA, and CA 19-9: a prognostic factor for uterine carcinosarcomas?* Arch Gynecol Obstet, 2013. **287**(1): p. 97-102.
16. Schmidt, C., *CA-125: a biomarker put to the test.* J Natl Cancer Inst, 2011. **103**(17): p. 1290-1.
17. Fernandez-Llamaazares, J., et al., *SCC antigen in patients with esophageal cancer.* Int J Biol Markers, 1992. **7**(4): p. 267.
18. Wu, E., et al., *CA 19-9 and pancreatic cancer.* Clin Adv Hematol Oncol, 2013. **11**(1): p. 53-5.
19. Vaur, J.L., [Alpha feto protein]. Infirm Fr, 1982(232): p. 27-8.
20. Chaturvedi, R., et al., *Purification of alpha feto protein from human cord blood.* Prep Biochem Biotechnol, 1998. **28**(4): p. 293-303.
21. He, A., et al., *A novel immunoassay for the quantization of CYFRA 21-1 in human serum.* J Clin Lab Anal, 2013. **27**(4): p. 277-83.
22. Yan, H., et al., *NSE can predict the sensitivity to definitive chemoradiotherapy of small cell carcinoma of esophagus.* Med Oncol, 2014. **31**(1): p. 796.
23. Pezaro, C., H.H. Woo, and I.D. Davis, *Prostate cancer: measuring PSA.* Intern Med J, 2014. **44**(5): p. 433-40.
24. Guan, X.F., et al., [Changes of AFP and beta-hCG in testicular tumors analyzed by a function method]. Zhonghua Nan Ke Xue, 2013. **19**(1): p. 59-62.
25. Konishi, F., [Clinical significance of CA 72-4 assay as a tumor marker]. Nihon Rinsho, 1990. **48 Suppl**: p. 974-7.
26. Gruson, D., T. Lepoutre, and F. Smits, *Chromogranin-A levels measured with automated immunoassay.* Int J Biol Markers, 2014: p. 0.
27. Rehfeld, J.F., et al., *An evaluation of chromogranin A versus gastrin and progastrin in gastrinoma diagnosis and control.* Biomark Med, 2014. **8**(4): p. 571-80.

28. Yoo, C., et al., *Prognostic impact of beta-2 microglobulin in patients with extranodal natural killer/T cell lymphoma*. *Ann Hematol*, 2014. **93**(6): p. 995-1000.
29. Bie, Y. and Z. Zhang, *Diagnostic value of serum HE4 in endometrial cancer: a meta-analysis*. *World J Surg Oncol*, 2014. **12**(1): p. 169.
30. Angioli, R., et al., *A critical review on HE4 performance in endometrial cancer: where are we now?* *Tumour Biol*, 2014. **35**(2): p. 881-7.
31. Burtis, C.A., et al., *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 2008: Saunders Elsevier.
32. Lewis, S.M., et al., *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 2006: Churchill Livingstone/Elsevier.